

2. Literatur

2.1. Die Anfänge der Mg^{2+} -Forschung

Obwohl das Element Magnesium seit etwa 1810 bekannt ist (TRENEER, 1963), fanden erste Untersuchungen zur Resorption des Magnesiums erst in den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts statt. Auslöser für die beginnende veterinärmedizinische Forschung auf diesem Gebiet war mithin die Erkenntnis, dass ein Mangel an Magnesium, dessen Bedeutung im lebenden Organismus in jener Zeit (um 1926) in ersten Arbeiten Erwähnung fand (AIKAWA, 1963), ursächlich für die Weidetetanie der Wiederkäuer ist (SJOLLEMA, 1930).

Seitdem wurde eine Vielzahl von Untersuchungen zur Rolle des Mg^{2+} im Organismus durchgeführt. Aber erst die letzten 20 Jahre brachten detailliertere Erkenntnisse über den Transport, die Akkumulation und Regulation von Mg^{2+} im Gewebe und auf zellulärer Ebene.

2.2. Die Bedeutung von Mg^{2+} im Organismus

Mg^{2+} ist an einer Vielzahl fundamentaler biochemischer Prozesse beteiligt, ohne die ein Leben nicht möglich ist (SARIS et al., 2000). ATPasen, Phosphatasen und Kinasen benötigen Mg^{2+} zur Aktivierung. Die Synthese und Ausschüttung verschiedener Hormone ist an Mg^{2+} gebunden. Mg^{2+} stabilisiert die Kern-DNA wie auch das Zytoskelett. Mg^{2+} beeinflusst die Aktivität einer Vielzahl von Transportproteinen, wie Pumpen, Carrier und Kanäle; und nicht zuletzt spielt es eine Rolle bei der Muskelkontraktion. Diese Beispiele zeigen nur einen kleinen Ausschnitt der Prozesse, an denen dieses Ion beteiligt ist.

Die essenzielle Bedeutung des Mg^{2+} für grundlegende biologische Prozesse steht im Kontrast zum Wissen um Mechanismen, Gene und Proteine, welche die Mg^{2+} -Homöodynamik auf zellulärer Ebene und im Gesamtorganismus regeln.

Die Gründe dafür lagen zum einen am anfänglich geringen Interesse, Mg^{2+} in seiner Rolle als Kofaktor zu untersuchen, zum anderen an der Schwierigkeit, Methoden zu etablieren, mit denen Änderungen der zellulären $[Mg^{2+}]$ festzustellen waren.

Das geringe Interesse resultierte aus der Tatsache, dass man zwar um die Bedeutung des Mg^{2+} als Kofaktor essenzieller zellulärer Prozesse wusste, man aber nur geringe Änderungen der intrazellulären $[Mg^{2+}]$ in Abhängigkeit von der zellulären Aktivität erwartete. Mg^{2+} , das nach K^+ das zweithäufigst vorkommende zelluläre Kation ist, ist intrazellulär im Überfluss vorhanden. Aus diesem Grund schien es unwahrscheinlich, dass Mg^{2+} als An-Aus-Schalter enzymatischer Prozesse wie etwa Ca^{2+} oder andere second messenger dienen könnte. Die intrazelluläre $[Mg^{2+}]$ wurde als „statisch“ postuliert (ROMANI und MAGUIRE, 2002).

Diese Vorstellung änderte sich erst in den letzten 25 Jahren, nachdem mithilfe verbesserter und neu entwickelter Messmethoden signifikante Änderungen der intrazellulären $[Mg^{2+}]$ gemessen wurden, die zudem unterschiedlichen hormonellen und nichthormonellen Einflüssen unterlagen.

Auch wenn die Mg^{2+} -Homöodynamik scheinbar „langsam“ vor sich geht, hat Mg^{2+} eine große physiologische und konsequenterweise auch pharmakologische Rolle in der Modulation zellulärer und gewebespezifischer Funktionen.

In den nachfolgenden Abschnitten wird dargestellt, wie Mg^{2+} bei eukaryotischen Zellen verteilt ist, welche Transportprozesse an der Mg^{2+} -Homöodynamik beteiligt sind und wie diese reguliert werden. Zuletzt wird erörtert, ob Mg^{2+} selbst als ein regulatorisches Kation gesehen werden kann.

2.3. Die zelluläre Mg^{2+} -Verteilung

Die Gesamt- Mg^{2+} -Konzentration der meisten Säugetierzellen beträgt zwischen 14 und 20 mmol/l (ROMANI und SCARPA, 1992). Damit ist Mg^{2+} nach K^+ das zweithäufigst vorkommende intrazelluläre Kation. Im Zytosol, in den Zellorganellen sowie im Zellkern liegt es in gebundener sowie in freier Form vor.

2.3.1. Mg^{2+} in den Zellorganellen

Mg^{2+} scheint gleichmäßig über den Kern, die Mitochondrien und das endo- bzw. sarkoplasmatische Reticulum verteilt zu sein. Untersuchungen der einzelnen Zellkompartimente mittels Elektronenstrahl-Mikroanalyse bei Zellen der Skelett- (SOMLYO et

al., 1985) und glatten Muskulatur (ZIEGLER et al., 1992), Kardiomyozyten (SHUMAN und SOMLYO, 1987), Hepatozyten (DALAL et al., 1998) und HL60-Leukämiezellen (DI FRANCESCO et al., 1998) ergaben eine Gesamtkonzentration von 14 bis 18 mmol/l Mg^{2+} in jeder dieser Zellorganellen.

Das zelluläre Mg^{2+} ist an Phospholipide, Proteine, Chromatin, Nukleinsäuren und Nukleotide, speziell ATP, gebunden, d. h. nur ein geringer Teil liegt als frei verfügbares Mg^{2+} im Zytosol bzw. in den Zellorganellen vor.

RUTTER et al. (1990) sowie BRIERLEY et al. (1987) ermittelten eine freie $[Mg^{2+}]$ von 1.2 und 0.8 mmol/l in der Mitochondrienmatrix von Herz- und Leberzellen. Über die Konzentration von freiem Magnesium im Zellkern ist nichts bekannt und mit den derzeit vorhandenen Messmethoden ist es nicht möglich, Aussagen über die freie $[Mg^{2+}]$ im endo- bzw. sarkoplasmatischen Retikulum zu treffen.

2.3.2. Mg^{2+} im Zytosol

Im Zytosol liegt Mg^{2+} größtenteils in gebundener Form vor. Hauptsächlich werden Komplexe mit ATP und anderen Phosphonukleotiden gebildet (SCARPA und BRINLEY, 1981). Etwa 90% der zellulären ATP-Konzentration (bei den meisten Zellen etwa 5 mmol/l) liegt als Mg^{2+} -ATP-Komplex vor. Daneben binden auch Proteine, wie Calmodulin (OHKI et al., 1997) und Troponin C (WANG et al., 1998) Magnesium. Ob und in welchem Maß das an Proteine gebundene Mg^{2+} aber zur Aufrechterhaltung der freien $[Mg^{2+}]$ zur Verfügung steht, ist derzeit nicht bekannt.

Der Anteil an freiem, ungebundenem Mg^{2+} im Zytosol variiert in Abhängigkeit von der Konzentration verfügbarer Mg^{2+} -Liganden und der Aktivität der Zelle. Untersuchungen verschiedener Zelltypen mittels Fluoreszenztechniken, ^{31}P -NMR (nuclear magnetic resonance)-Spektroskopie und elektrophysiologischen Messmethoden ergaben freie $[Mg^{2+}]$ zwischen 0.5 und 1 mmol/l (CORKEY et al., 1986; FATHOLAHİ et al., 2000; GÜNTHER et al., 1995; GÜNZEL und GALLER, 1991; GÜNZEL und SCHLUE, 1996; HALL et al., 1991; HARMAN et al., 1990; HINTZ et al., 1999; LUTHI et al., 1997; MOTTET et al., 1997; RAJU et al., 1989; TASHIRO und KONISHI, 1997; WATANABE et al., 1998; ZHANG et al., 1997).

2.4. Die Mg^{2+} -Homöodynamik

Um die Zellfunktion aufrechtzuerhalten, ist es notwendig, dass die freie $[Mg^{2+}]$ in der Zelle relativ konstant gehalten wird. Dabei variiert die Dauer des Austausches von Mg^{2+} zwischen Plasma und Zelle je nach Zelltyp deutlich. Bei Herzmuskel-, Nierenepithelzellen und Zellen des Fettgewebes findet ein kompletter Austausch („turn over“) zwischen intrazellulärem Mg^{2+} und dem Plasma- Mg^{2+} innerhalb von 3 bis 4 Stunden statt (ELLIOTT und RIZACK, 1974; PAGE und POLIMENI, 1972; POLIMENI und PAGE, 1973; ROGERS, 1965; ROGERS und MAHAN, 1959). Bei Neuronen und Skelettmuskelzellen (ROGERS, 1965; ROGERS und MAHAN, 1959) konnte nach 16 Stunden ein Austausch von nur 10 bzw. 25% des Mg^{2+} festgestellt werden. Und Lymphozyten ersetzen innerhalb von 40 Stunden Inkubationszeit nur etwa 5-7% des intrazellulären Mg^{2+} gegen extrazelluläres Mg^{2+} (GRUBBS et al., 1984).

Welche Transportprozesse kommen für einen derartigen Austausch in Frage? Um dies zu klären, müssen zunächst die chemischen und elektrochemischen Verhältnisse, denen diese Transporte unterworfen sind, bekannt sein.

Die $[Mg^{2+}]$ beträgt im Plasma und der extrazellulären Flüssigkeit etwa 1.2-1.4 mmol/l (QUAMME, 1993). Wiederum ein Drittel davon ist an Plasmaproteine und andere zirkulierende Biomoleküle gebunden (ALLOUCHE et al., 1999; QUAMME, 1993).

Bei einer intrazellulären $[Mg^{2+}]$ zwischen 0.5 und 1 mmol/l herrschen „Null Transport“-Bedingungen, wenn der Transport nur in Abhängigkeit vom Konzentrationsgradienten betrachtet wird. Unter physiologischen Bedingungen ist aber zusätzlich eine Potentialdifferenz über die Membran (Innenseite negativ) ausgebildet und damit verbunden auch eine Triebkraft für Kationen zur intrazellulären Seite der Zellmembran. Aufgrund dieses elektrischen Gradienten könnte ein einwärts gerichteter Mg^{2+} -Fluss (Influx) auch unabhängig vom Konzentrationsgradienten stattfinden.

Bei Säugetierzellen liegt das Potenzialäquilibrium für freies intrazelluläres Mg^{2+} bei etwa 50 mmol/l (ROMANI und MAGUIRE, 2002). Dabei handelt es sich aber um einen theoretischen Wert, der in natura nicht erreicht wird, da die Zellmembran relativ impermeabel für Mg^{2+} ist. Dennoch macht dieser Wert klar, dass ein Mechanismus zum Mg^{2+} -Transport aus der Zelle hinaus (Efflux) existieren muss, um einem Anstieg der $[Mg^{2+}]_i$, insbesondere in einer O_2 -Mangelsituation oder nach einem Abfall der zellulären [ATP], entgegenzuwirken. Denn unter

physiologischen Bedingungen wird die freie $[Mg^{2+}]$ zur Erhaltung der Zellfunktion konstant auf einem Niveau gehalten.

2.5. Der Mg^{2+} -Transport über biologische Membranen

Die ersten Studien zum Mg^{2+} -Transport bei Säugetierzellen wurden an Adipozyten (ELLIOTT und RIZACK, 1974) durchgeführt. Seither wurden in einer Reihe von physiologischen Untersuchungen verschiedene Theorien zu dem Mg^{2+} -Transport über biologische Membranen und zu den daran beteiligten Transportproteinen (Pumpen, Carrier und Kanäle) entwickelt. So vermuteten GRUBBS und MAGUIRE (1987; MAGUIRE, 1990), dass sich Mg^{2+} -Transporter aufgrund der besonderen Chemie des Mg^{2+} (die Ladung und somit auch die Hydrathülle des Kations sind wesentlich größer als die anderer physiologisch relevanter Ionen) von den bekannten Transportsystemen unterscheiden (SMITH und MAGUIRE, 1998).

Doch erst die molekularbiologische Identifizierung und Klonierung von primär Mg^{2+} transportierenden Proteinen in der letzten Zeit brachte detailliertere Informationen über die Struktur und über die Funktionsmechanismen von Mg^{2+} -Transportern hervor.

2.5.1. Mg^{2+} -Influxmechanismen

Im Rahmen zellphysiologischer Untersuchungen wurden bei verschiedenen Zellsystemen transmembranöse Mg^{2+} -Leitfähigkeiten beobachtet. Aufgrund des einwärtsgerichteten elektrochemischen Gradienten wurde angenommen, dass die Aufnahme von Mg^{2+} elektrodifusiv über Mg^{2+} -Kanäle erfolgt. Hinweise dafür fand man bei Nierenzellen (FREIRE et al., 1996), Darmzellen (BIJVELDS et al., 2001), Rattenneuronen (STOUT et al., 1996), Herzmuskelzellen (QUAMME und RABKIN, 1990) und Pansenepithelzellen (SCHWEIGEL et al., 1999), aber auch bei Prokaryonten (SMITH und MAGUIRE, 1995).

An Prokaryonten konnten auch die ersten Mg^{2+} -Transporter molekulargenetisch charakterisiert werden (KEHRES und MAGUIRE, 2002; SMITH et al., 1993). Dabei wurden Gene identifiziert, welche für Transporter der sogenannten CorA (cobalt resistance)-Familie kodieren. Diese CorA- Mg^{2+} -Transporter werden durch Cobalt(III)hexamin³⁺ (**Abb. 1**), das eine mit dem hydratisierten Mg^{2+} vergleichbare Struktur aufweist (BASOLO und PEARSON, 1967; MEEK und IBERS, 1970), gehemmt (BIJVELDS et al., 2001; KUCHARSKI et al., 2000).

MAGUIRE (2001) schloss daraus, dass Mg^{2+} diesen CorA- Mg^{2+} -Transporter nicht mitsamt seiner Hydrathülle passiert, sondern diese vorher abstreift.

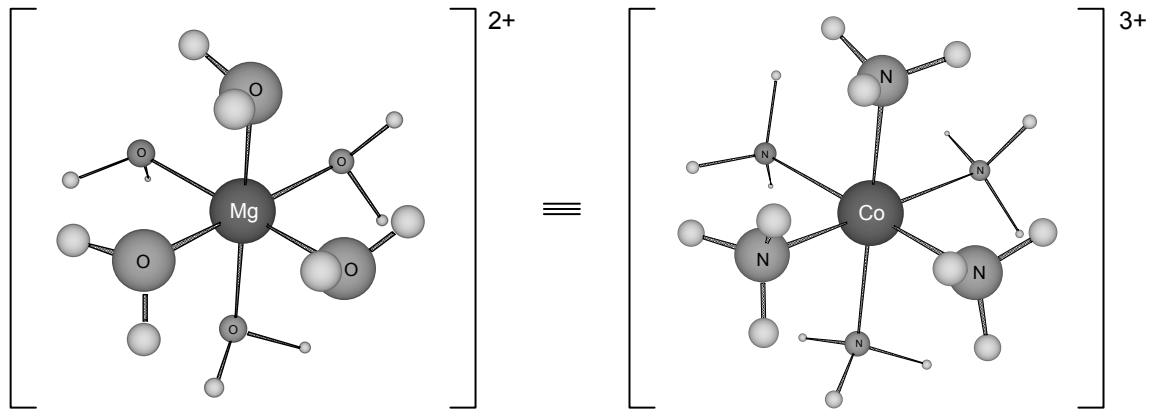


Abb. 1: Hydratisiertes Mg^{2+} vs. Cobalt(III)hexamin $^{3+}$

Cobalt(III)hexamin $^{3+}$ besitzt eine mit dem hydratisierten Mg^{2+} -Kation vergleichbare Geometrie und Größe (BASOLO und PEARSON, 1967; MEEK und IBERS, 1970).

CorA-Homologe wurden auch in der Plasmamembran von Pilzen (ALR, aluminum resistance; MACDIARMID und GARDNER, 1998) und eukaryotischen Mitochondrien (MRS2, mitochondrial rna splicing2; BUI et al., 1999; KOLISEK et al., 2003; SCHWEYEN, 2000) gefunden.

Bei Säugetieren konnten bisher zwei Mg^{2+} -Transporter auf molekularer Ebene identifiziert werden. Die erst seit kurzem bekannten Kanäle TRPM6 (auch Chak2; SCHLINGMANN et al., 2002) und TRPM7 (auch TRP-PLIK, Chak1 oder LTRPC7; NADLER et al., 2001; RUNNELS et al., 2002) gehören zur Familie der TRP (transient receptor protein)-Kationenkanäle, welche auch eine Rolle beim Ca^{2+} -Transport spielen. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass der TRPM7-Kanal die Aufnahme von Mg^{2+} und Ca^{2+} vermittelt, wobei der Kanal durch hohe intrazelluläre Konzentrationen von Mg^{2+} und Mg^{2+} -ATP gehemmt wird (NADLER et al., 2001). Die Regulation der Mg^{2+} -Aufnahme erfolgt dabei über die funktionelle Verknüpfung von Kinasedomänen mit einem Kanal-Gatingmechanismus (SCHMITZ et al., 2003).

2.5.2. Mg²⁺-Effluxmechanismen

Viele der frühen Untersuchungen zum zellulären Mg²⁺-Transport fanden an Erythrozyten statt. FERAY und GARAY (1986; 1988) sowie GÜNTHER und VORMANN (1985; 1987) zeigten, dass bei diesen Zellen intrazelluläres Mg²⁺ gegen extrazelluläres Na⁺ ausgetauscht wird.

Neben einem solchen Na⁺-abhängigen Mg²⁺-Efflux wurden aber auch vom Na⁺ unabhängige Fluxe gemessen. Unter bestimmten „künstlichen“ Versuchsbedingungen wurden Mg²⁺-Fluxe festgestellt, auch wenn kein extrazelluläres Na⁺ vorhanden war (FERAY und GARAY, 1987).

Messungen an reinen Plasmamembranvesikeln erweiterten das Verständnis um Mg²⁺-Transportmechanismen über biologische Membranen.

Na⁺-abhängiger Mg²⁺-Efflux

GÜNTHER et al. (1984) beluden Erythrozyten, um zu beobachten, wie das überschüssige Mg²⁺ in den Extrazellulärraum abgegeben wird. Die Beladung war notwendig, da ein Efflux bei Erythrozyten nur durch die Erhöhung der [Mg²⁺]_i über den Normwert induziert werden konnte. Die Zellen zeigten unter diesen experimentellen Bedingungen einen Na⁺-abhängigen Mg²⁺-Efflux, der durch Zyanat, Iodo-Azetat und extrazelluläres Mg²⁺ bzw. Mn²⁺ (3 mmol/l) gehemmt wurde.

Die strikte Na⁺-Abhängigkeit dieses Mechanismus wurde dadurch gestützt, dass Na⁺ weder durch Lithium noch durch andere monovalente Kationen effektiv ersetzt werden konnte. Desweiteren wurde der Mg²⁺-Flux durch Amilorid, von dem bekannt ist, dass es in relativ hohen Konzentrationen (1 mmol/l) eine Blockade Na⁺-abhängiger Austauschmechanismen bewirkt, gehemmt.

FERAY und GERAY (1988) setzten Imipramin und Quinidin als unspezifische Hemmstoffe dieses Transportes ein und postulierten, dass der Energiestatus der Zelle eine wichtige Rolle für den Mg²⁺-Efflux spielt (FERAY und GARAY, 1986).

Die an Erythrozyten festgestellten Transporteigenschaften waren auch bei einer Vielzahl anderer Zelltypen vorhanden (**Tab. 1**). So wiesen Kardiomyozyten (ROMANI et al., 1993a; VORMANN und GÜNTHER, 1987), Hepatozyten (ROMANI et al., 1993), Ehrlich-Asziteszellen (WOLF et al., 1994a), Milzlymphozyten (WOLF et al., 1997) und Azinuszellen der Glandula sublingualis (ZHANG und MELVIN, 1996) einen Na⁺-abhängigen Mg²⁺-Transport auf. Vieles

deutet darauf hin, dass der Transport über einen Carrier (Antiporter), der allgemein als $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher bezeichnet wird, vermittelt wird.

Tab. 1: Gewebe, bei denen die Existenz des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers nachgewiesen bzw. angenommen wurde (ROMANI und SCARPA, 2000)

Gewebe	Literatur
Erythrozyten (Huhn)	(GÜNTHER und VORMANN, 1985)
Erythrozyten (Truthahn)	(GÜNTHER und VORMANN, 1985)
Erythrozyten (Ratte)	(GÜNTHER et al., 1990a)
Erythrozyten (Frettchen)	(FLATMAN und SMITH, 1990)
Erythrozyten (Hamster)	(XU und WILLIS, 1994)
Erythrozyten (Mensch)	(FERAY und GARAY, 1986; 1988; GÜNTHER und VORMANN, 1985; LÜDI und SCHATZMANN, 1987)
Thymozyten	(GÜNTHER und VORMANN, 1992a)
Lymphozyten	(WOLF et al., 1997)
HL60-Leukämiezellen	(WOLF et al., 1996; 1998)
Glatte Muskelzellen (Blinddarm, Meerschweinchen)	(TASHIRO und KONISHI, 1997)
Glatte Muskelzellen (Mesenterialarterie)	(TOUYZ und SCHIFFRIN, 1996)
Ileale Bürstensaumzellen (Kaninchen)	(JÜTTNER und EBEL, 1998) ¹
Azinuszellen der Glandula sublingualis	(ZHANG und MELVIN, 1996)
Herzzellen (Ratte)	(HANDY et al., 1996; MURPHY et al., 1991; ROMANI et al., 1993a; VORMANN und GÜNTHER, 1987)
Leberzellen (Ratte)	(FAGAN und ROMANI, 2000; GÜNTHER und HOLLRIEGL, 1993; GÜNTHER et al., 1991; ROMANI et al., 1993; TESSMAN und ROMANI, 1998) und (CEFARATTI et al., 1998) ¹
Ehrlich-Asziteszellen	(WOLF et al., 1994; 1994a)
Tintenfischaxone	(DI POLO und BEAUGE, 1988)
Rankenfußermuskulatur	(BAKER und CRAWFORD, 1972)
Blutegelneurone	(GÜNZEL und SCHLUE, 1996)
Pantoffeltierchen	(CLARK et al., 1997) ²

¹ Die Existenz des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers wurde bei diesen Organen an Plasmamembranvesikeln untersucht.

² Bei Pantoffeltierchen wurden Na^+ - und Mg^{2+} -Ströme über die Plasmazellmembran aufgezeichnet.

Während Erythrozyten künstlich mit Mg^{2+} beladen werden mussten, zeigte sich, dass der $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher bei anderen Zellen auch ohne Manipulation der intra- oder extrazellulären Ionenkonzentrationen mit einer basalen Rate arbeitete (HANDY et al., 1996; TASHIRO und KONISHI, 1997).

Aufgrund der unterschiedlichen Zelltypen und den voneinander abweichenden Versuchsbedingungen gestaltet sich der Vergleich der Eigenschaften des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers zwischen den verschiedenen, aber auch ähnlichen Zellen, oftmals kontrovers.

So konnten GRUBBS et al. (1985) bei S49-Lymphomzellen keinen Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Efflux feststellen, wogegen der Austauscher bei isolierten Milzlymphozyten der Ratte nachgewiesen wurde (WOLF et al., 1997). Ähnliche Beobachtungen wurden bei ventrikulären Herzmuskelzellen gemacht. HANDY et al. (1996) wie auch TASHIRO und KONISHI (1997) fanden Beweise für Existenz des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers bei Kardiomyozyten, welche bei FREUDENRICH et al. (1992) sowie MURPHY et al. (1991) fehlten.

Unterschiede gibt es auch in Bezug auf die Stöchiometrie des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers. So schlugen LÜDI und SCHATZMAN (1987) sowie FLATMAN und LEW (1981) bei humanen Erythrozyten ein Austauschverhältnis von 3 Na^+ zu 1 Mg^{2+} vor. Mit Änderung der Versuchsbedingungen konnten sie zudem ein $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Verhältnis von 1:1 beobachten. GÜNTHER et al. (1984) berechneten dagegen nach Messungen mit Erythrozyten von Hühnern, Truthähnen und Menschen einen elektroneutralen Austausch im Verhältnis 2:1.

Daneben ließen sich dem $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher ähnelnde Transportprozesse beobachten. Bei Erythrozyten (GÜNTHER und VORMANN, 1987) und perfundierten Rattenherzen (MAGUIRE, 1984) zeigte sich ein Austausch von Mg^{2+} gegen Mg^{2+} . GÜNTHER und VORMANN (1987) setzten die Radioisotope ^{24}Mg und ^{28}Mg ein, um die Aktivität dieses Transportmechanismus zu quantifizieren. Der für den $\text{Mg}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Austausch ermittelte K_M -Wert entsprach dabei dem für den $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher festgestellten K_M -Wert (GÜNTHER und VORMANN, 1985). Dies führte zu der Hypothese, dass sich Mg^{2+} oder andere divalente Kationen (z.B. Mn^{2+}) bei einer erniedrigten extrazellulären $[\text{Na}^+]$ an die extrazelluläre Bindungsstelle des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers anlagern können und dadurch den Transport aktivieren bzw. aktiv halten. Möglicherweise findet ein $\text{Mg}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Austausch auch bei einer physiologischen extrazellulären $[\text{Na}^+]$ statt.

Na^+ -unabhängiger Mg^{2+} -Efflux

Neben dem $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher existieren offensichtlich auch vom Na^+ unabhängige Effluxmechanismen. GÜNTHER und VORMANN (1990) sowie GÜNTHER et al. (1990) zeigten, dass unter Bedingungen, bei denen Na^+ durch den Einsatz von Na^+ -Transportinhibitoren für einen Austausch gegen Mg^{2+} nicht zur Verfügung stand oder Na^+ durch andere monovalente Kationen ersetzt wurde (FERAY und GARAY, 1987; GÜNTHER und VORMANN, 1990a; ROMANI et al., 1992; 1993), auch weiterhin Mg^{2+} aus der Zelle transportiert wurde.

Bei verschiedenen Zellen wurde der Austausch divalenter Kationen aus dem Extrazellulärraum gegen intrazelluläres Mg^{2+} beobachtet. So stellten GÜNTHER und VORMANN (1987) wie auch GÜNTHER et al. (1990) fest, dass der Transport über diesen „alternativen“ Mg^{2+} -Effluxmechanismus von der extrazellulären Mn^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentration abhängig war. FERAY und GARAY (1987) bestätigten dies und gaben für den Mn^{2+}/Mg^{2+} -Austausch eine Stöchiometrie von 1:1 an. Ergänzend dazu wurde bei vergleichbaren Versuchsbedingungen eine Modulation des Transportes durch extrazelluläres Ca^{2+} , Strontium (Sr^{2+}) (CEFARATTI et al., 2000; ROMANI et al., 1993a), sowie durch die Anionen HCO_3^- und Cl^- (GÜNTHER et al., 1990) beobachtet.

Durch niedrige extrazelluläre $[Na^+]$ wurde ein Mg^{2+} -Efflux aktiviert, der durch Erhöhung der extrazellulären $[Na^+]$ bzw. durch die Gabe von Quinidin gehemmt werden konnte (CEFARATTI et al., 1998; GÜNTHER, 1993).

Eine Hemmung des Fluxes trat auch nach Erniedrigung der intrazellulären ATP-Konzentration auf. MAGUIRE (1984) wie auch GÜNTHER und VORMANN (1990) nahmen an, dass der Transportmechanismus durch Phosphorylierung aktiviert wird oder zumindest die Hydrolyse von ATP erfordert.

2.5.3. Die Rolle der Zellpolarität beim Mg^{2+} -Transport

Viele der Untersuchungen zum Mg^{2+} -Transport fanden an Erythrozyten statt. Erythrozyten unterscheiden sich aber von Zellen, die neben der eigenen zellulären Homöodynamik auch an der Aufrechterhaltung der $[Mg^{2+}]$ im Gesamtorganismus beteiligt sind. So sind beispielsweise Epithelzellen des Darmes und der Nierentubuli, aber auch Leberzellen, in einer bestimmten Position innerhalb des Gewebes eingegliedert und weisen eine apikal-basolaterale Zellpolarität auf. Dabei liegen an den apikalen und basolateralen Membranabschnitten unterschiedliche chemische und elektrochemische Gradienten vor. Dies führte zu der Frage, ob die unterschiedlichen Membranabschnitte auch über sich funktionell unterscheidende Mg^{2+} -Transportsysteme verfügen. Untersuchungen an Vesikeln der apikalen bzw. basolateralen Membranabschnitte dienten zur Klärung dieser Frage.

2.5.4. Der Mg^{2+} -Transport bei gereinigten Plasmamembranen

Plasmamembranvesikel wurden unter anderem aus Leberzellen (CEFARATTI et al., 1998; CEFARATTI et al., 2000), Bürstensaumzellen des Ileums (JÜTTNER und EBEL, 1998), Zellen des Duodenums und des Jejunums (BAILLIEN und COGNEAU, 1995; BAILLIEN et al., 1995) gewonnen und auf Mg^{2+} -Transportmechanismen untersucht.

Untersuchungen an Leberplasmamembranvesikeln lieferten Hinweise auf Existenz von drei Mg^{2+} -Transportmechanismen.

Bei Vesikeln der basolateralen Membran fand man einen Na^+/Mg^{2+} -Austauscher, der abhängig vom Na^+ -Gradienten Mg^{2+} in beide Richtungen transportierte (CEFARATTI et al., 1998; 2000). Dieser Transporter war hoch Na^+ -selektiv, arbeitete mit einer K_M für Na^+ von 20 mmol/l und wurde durch Imipramin, aber nicht durch Amilorid (CEFARATTI et al., 2000) oder dessen Derivate (CEFARATTI et al., 1998) gehemmt.

Die apikale Hepatozytenmembran enthielt zwei unidirektionale Mg^{2+} -Effluxmechanismen, die durch Na^+ bzw. Ca^{2+} aktivierbar waren (CEFARATTI et al., 2000). Für den Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Transport wurde ein dem basolateralen Austauscher ähnlicher K_M -Wert errechnet. Amilorid und Imipramin hemmten den Transport beider Austauscher. Im Unterschied zum Na^+ -abhängigen Austauscher wurde der Ca^{2+} -abhängige Austauscher durch Ca^{2+} oder andere divalente Kationen mit einer K_M von etwa 50 μ mol/l aktiviert.

Während dieser Experimente wurde ein Mg^{2+} -Transport beobachtet, obwohl kein Konzentrationsgradient für Mg^{2+} vorlag („Null Transport“-Bedingungen). Aufgrund dieser Beobachtung nahmen CEFARATTI et al. (1998) an, dass die Triebkraft für den Transport in erster Linie durch Konzentrationsgradienten der im Austausch gegen Mg^{2+} transportierten Kationen entstand.

Keiner der drei Transporter benötigte intravesikuläres ATP, um den Transport aufrechtzuerhalten (CEFARATTI et al., 1998). Durch den Zusatz alkalischer Phosphatase wurde der Transport in allen drei Fällen gehemmt, was CEFARATTI et al. (1998) vermuten ließ, dass die Transporter über Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung reguliert werden.

Auch an Vesikeln ilealer Bürstensaumzellen zeigte sich ein Na^+ -abhängiger Mg^{2+} -Transport. Dieser wies eine Sättigungskinetik mit einem K_M -Wert für Na^+ von 16 mmol/l auf. Der K_M -Wert lag in einem Bereich, der auch bei anderen Zellen im Rahmen von Untersuchungen zum

Na⁺/Mg²⁺-Austauscher (CEFARATTI et al., 1998; 2000a; GÜNTHER, 1996; GÜNTHER und VORMANN, 1985; MAGUIRE et al., 1984; TASHIRO und KONISHI, 1997) beobachtet wurde.

Obwohl die Versuchsbedingungen nicht immer die physiologischen Bedingungen (e.g. [Na⁺]_i > [Na⁺]_e) widerspiegeln, und trotz der kontroversen Ergebnisse, wurde zusammenfassend festgestellt, dass auch für Mg²⁺ verschiedene Transportmechanismen existieren, welche hormonell reguliert werden.

2.6. Die Beeinflussung der Mg²⁺-Homöodynamik durch Hormone und Mediatoren

Erste Untersuchungen zur hormonellen Beeinflussung des Mg²⁺-Transportes gab es bereits im Jahr 1974. Zu dieser Zeit existierten kaum Kenntnisse über spezifische Mg²⁺-Transportsysteme. Dennoch zeigten die Untersuchungen von ELLIOTT und RIZACK (1974), dass die zelluläre Mg²⁺-Homöodynamik bei Adipozyten durch Epinephrin und adrenocorticotropes Hormon (ACTH) beeinflusst wurde. Die Hormonstimulation führte zur Akkumulation von Mg²⁺ in den Zellen und an der Plasmamembran.

2.6.1. Die Modulation des Mg²⁺-Transportes

Weiterführende Untersuchungen zur hormonellen Modulation von Mg²⁺-Fluxen fanden an S49-Lymphomzellen, primären Lymphozyten und verschiedenen anderen Zellen statt (ERDOS und MAGUIRE, 1983; GRUBBS und MAGUIRE, 1986; GRUBBS et al., 1985; MAGUIRE, 1982; MAGUIRE und ERDOS, 1978; 1980).

Die Aufnahme von Mg²⁺ in S49-Lymphomzellen wurde spezifisch durch β -adrenerge Agonisten und PGE₁ gehemmt und durch Proteinkinase C-Inhibitoren stimuliert. Die Mg²⁺-Abgabe blieb dagegen unverändert. Versuche mit klonierten S49-Zellen, denen Proteinkinase A oder Adenylatzyklase fehlten, zeigten, dass die über β -adrenerge Rezeptoren aktivierte Hemmung nicht über cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder Proteinkinase A kontrolliert wurde und damit unabhängig vom klassischen Signaltransduktionsweg funktionierte (MAGUIRE und ERDOS, 1980). Neben der klassischen Signalkaskade musste also mindestens ein zusätzlicher, alternativer Signalweg existieren.

Im Gegensatz zum relativ langsamen Transport bei S49-Lymphomzellen und primären Lymphozyten (Turnover-Rate von > 40 Stunden) berichteten GÜNTHER et al. (1991), JAKOB et al. (1989) sowie ROMANI und SCARPA (1990; 1990a) von einem massiven Netto-Mg²⁺-Efflux bei Versuchen mit perfundierten Herzen und Lebern, der innerhalb weniger Minuten nach Stimulation durch α - und β -adrenerge Agonisten eintrat. Verschiedene Gewebe verloren dabei in einem Zeitraum zwischen 15 und 30 Minuten mehr als 15% des gesamten intrazellulären Mg²⁺.

Nach der Infusion von Isoproterenol und anderen Katecholaminen wurde bei anästhesierten Ratten ein dosisabhängiger Anstieg der Serum-Mg²⁺-Konzentration festgestellt (GÜNTHER und VORMANN, 1992; KEENAN et al., 1995). Innerhalb der ersten 10 Minuten nach Infusion der Agonisten stieg die Serum-Mg²⁺-Konzentration von 0.7 mmol/l auf 0.9 mmol/l an und blieb für mindestens 90 Minuten auf dem erhöhten Wert. Der Anstieg der Serum-Mg²⁺-Konzentration konnte durch den Einsatz von Propranolol und anderen selektiven Blockern der β -adrenergen Rezeptoren verhindert werden.

2.6.2. Die hormonelle Stimulation des Mg²⁺-Effluxes

Die nach Stimulation β -adrenerger Rezeptoren beobachtete Steigerung der Mg²⁺-Effluxrate bei Herz- und Leberzellen konnte auch in Versuchen mit Erythrozyten (MATSUURA et al., 1993), Thymozyten (GÜNTHER und VORMANN, 1992a), primären Lymphozyten (WOLF et al., 1997), Ehrlich-Asziteszellen (WOLF et al., 1996) sowie Zellen der Unterzungspeicheldrüse (ZHANG und MELVIN, 1992) festgestellt werden.

Diese Zellen zeigten zudem eine Zunahme des Effluxes nach Applikation zellpermeabler cAMP-Analoga (8-Chloro-cAMP, 8-Bromo-cAMP oder Dibutyryl-cAMP) sowie nach Forskolin-induzierter Erhöhung der zellulären cAMP-Konzentration (**Tab. 2**; FAGAN und ROMANI, 2001; GÜNTHER und VORMANN, 1992a; HOWARTH et al., 1994; MATSUURA et al., 1993; ROMANI und SCARPA, 1990; 1990a; 2000; WOLF et al., 1997). Dagegen wurde der Prozess durch das R_p-cAMP Isomer, einen Blocker der Adenylatzyklase, stark gedrosselt (WOLF et al., 1997).

Zusätzlich führte Insulin bei perfundierten Herzen (ROMANI et al., 2000) bzw. Lebern (KEENAN et al., 1996) zu einer Hemmung des durch Isoproterenol und zellpermeable cAMP-Analoga aktivierten Mg^{2+} -Effluxes. Bei Aktivierung durch den α_1 -adrenergen Agonisten Phenylephrin ließ sich dagegen kein hemmender Effekt durch Insulin feststellen (KEENAN et al., 1996).

Auch die Applikation von Arachidonsäure, PGE_1 bzw. PGE_2 , führte bei primären Lymphozyten und Ehrlich-Asziteszellen zu einem Anstieg der zellulären [cAMP] und induzierte einen Mg^{2+} -Efflux (WOLF et al., 1996; 1997). Zusammenfassend führten diese Beobachtungen zu der Vermutung, dass cAMP als second messenger eine Rolle bei der Aktivierung des Mg^{2+} -Effluxes spielt (GÜNTHER und VORMANN, 1992a).

Tab. 2: Zelltypen, bei denen nach Applikation verschiedener Wirkstoffe ein cAMP-induzierter Mg^{2+} -Efflux festgestellt wurde (ROMANI und SCARPA, 2000)

Zelltyp	Wirkstoff	Literaturangabe
Herzzellen (Ratte)	Norepinephrine, Forskolin, cAMP-Analoge	(ROMANI und SCARPA, 1990)
Herzzellen (Ratte)	Isoproterenol	(VORMANN und GÜNTHER, 1987)
Herzzellen (Ratte)	Isoproterenol, Forskolin	(HOWARTH et al., 1994)
Leberzelle (Ratte)	Norepinephrin, Forskolin, cAMP-Analoge	(ROMANI und SCARPA, 1990a)
Leberzelle (Ratte)	Norepinephrin	(GÜNTHER et al., 1991)
Leberzelle (Ratte)	Phenylephrin	(ROMANI et al., 1991)
Leberzelle (Ratte)	Epinephrine, Isoproterenol, Phenylephrin	(KEENAN et al., 1996)
Erythrozyten	Isoproterenol, Forskolin, cAMP-Analoge	(MATSUURA et al., 1993)
Lymphozyten	cAMP-Analoge, PGE_1 , IFN- α	(WOLF et al., 1997)
Ehrlich Asziteszellen	cAMP-Analoge, PGE_1 , PGE_2	(WOLF et al., 1994)
Ehrlich Asziteszellen	ATP, Arachidonsäure	(WOLF et al., 1996)
HL60-Leukämiezellen	db-cAMP, Forskolin	(WOLF et al., 1998)
Thymozyten	db-cAMP	(GÜNTHER und VORMANN, 1992a)
Zellen der Unterzungenspeicheldrüse	Forskolin	(ZHANG und MELVIN, 1992)

Andere Untersuchungen ließen darauf schließen, dass auch ein Signalweg existieren muss, der über α_1 -adrenerge Rezeptoren aktiviert wird und im Stande ist, Signale unabhängig von cAMP zu vermitteln. Studien an perfundierten Lebern und isolierten Leberzellen (FAGAN und ROMANI, 2001) zeigten, dass nach Stimulation durch β - bzw. α_1 -adrenerge Agonisten Fluxe feststellbar waren (1.1 bzw. 2.2 $\mu\text{mol}/8 \text{ min}$), die zusammengenommen dem nach Katecholamingabe beobachteten Efflux von 3.4 $\mu\text{mol}/8 \text{ min}$ entsprachen. Zusätzlich stellten

FAGAN und ROMANI (2001) fest, dass der über α_1 -adrenerge Rezeptoren aktivierte Signalweg einen Anstieg der intrazellulären $[Ca^{2+}]$ erforderte, um Ca^{2+} -Signalprozesse zu aktivieren.

Letztlich konnte aber in den vielen Experimenten nicht geklärt werden, ob die hormonelle Regulation selektiv an Efflux- oder Influxmechanismen bzw. an beiden stattfindet. Viele der untersuchten Zellen wiesen nach der Applikation von Hormonen unterschiedliche Änderungen der Transportrate auf, sodass es als wahrscheinlich gilt, dass je nach Zelltyp und der Anzahl beteiligter Rezeptoren diverse Influx- und Effluxmechanismen hormonell stimuliert werden.

2.6.3. Die hormonelle Stimulation des Na^+/Mg^{2+} -Austauschers

FAGAN und ROMANI (2000; 2001) führten Untersuchungen speziell zur hormonellen Beeinflussung des Na^+/Mg^{2+} -Austauschers durch. Der Na^+ -abhängige Transport wurde durch cAMP stimuliert. Weiterhin waren abhängig vom verwendeten Agonisten (Epinephrin bzw. Norepinephrin und Phenylephrin, nicht aber Isoproterenol) auch Ca^{2+} bzw. Ca^{2+} -abhängige Signalprozesse an der hormonellen Modulation des Transportes beteiligt.

FAGAN und ROMANI (2000; 2001) leiteten daraus ab, dass der Mg^{2+} -Efflux über den Na^+/Mg^{2+} -Austauscher durch cAMP (über β -adrenerge Rezeptorstimulation) sowie Ca^{2+} /Calmodulin (über α_1 -adrenerge Rezeptorstimulation) aktiviert wurde. Von beiden Prozessen wurde angenommen, dass sie abhängig von den Versuchsbedingungen gleichzeitig wie auch unabhängig voneinander ablaufen könnten.

2.6.4. Die hormonelle Stimulation der Mg^{2+} -Akkumulation bzw. des Mg^{2+} -Influges

In vielen Versuchen wurde untersucht, wie sich der Mg^{2+} -Efflux nach Hormonstimulation veränderte. Um die Mg^{2+} -Homöodynamik aufrechtzuerhalten, müssen aber auch Hormone oder Wirkstoffe existieren, welche einen Mg^{2+} -Influx bzw. eine Akkumulation von Mg^{2+} in der Zelle unterstützen.

Bei verschiedenen Gewebe- und Zelltypen (DAI und QUAMME, 1991; DAI et al., 1999; GRUBBS und MAGUIRE, 1986; RIJKERS und GRIFFIOEN, 1993; ROMANI et al., 1992; 1993a; 2000; TAKAYA et al., 1998) wurde nach Applikation von Wirkstoffen, die an

muskarinergen/cholinergen Rezeptoren wirken, wie Carbachol, Phorbolderivate oder Diacylglycerinanaloga oder von Hormonen, wie Vasopressin und Insulin, eine Zunahme der intrazellulären $[Mg^{2+}]$ beobachtet.

Diesen Agentien ist gemeinsam, dass sie Signalkaskaden aktivieren, die direkt (Carbachol und Insulin) oder indirekt über den Proteinkinase-C-Weg (Phorbolderivate, Diacylglycerinanaloga, Vasopressin und Insulin) zu einer Reduzierung des cAMP-Spiegels führen.

2.7. Die physiologische Bedeutung der Mg^{2+} -Regulation

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mechanismen existieren müssen, die durch eine Zunahme der zellulären cAMP- bzw. Ca^{2+} -Konzentration den Mg^{2+} -Efflux oder durch eine Abnahme der zellulären cAMP-Konzentration bzw. Aktivierung des Proteinkinase-C-Signalweges die Mg^{2+} -Akkumulation stimulieren. ROMANI et al. (1993) zeigten, dass das Umschalten vom Netto-Efflux auf eine Netto-Akkumulation und umgekehrt sehr schnell geschah. Dabei entsprach die Menge an Mg^{2+} , die aus der Zelle hinaus transportiert wurde, der akkumulierten $[Mg^{2+}]$.

Die Funktion von Mg^{2+} , welches nach metabolischen und hormonellen Stimuli aus einem dynamischen Pool hinaus- bzw. hineintransportiert werden kann, unterscheidet sich von den bisher bekannten Funktionen anderer Kationen – zumal keines der anderen Kationen nach hormoneller Stimulation in derartig großen Mengen in relativ kurzer Zeit bewegt wird.

GRUBBS und MAGUIRE (1987) sowie MAGUIRE (1990) nahmen an, dass Mg^{2+} als Regulator chronischer Prozesse oder als Langzeitregulator zellulärer Enzyme und Funktionen dient.

Wenn man sich vergegenwärtigt, dass Mg^{2+} die Funktionsweise von Schlüsselenzymen beeinflussen kann, ist es sogar vorstellbar, dass die hormoninduzierten Schwankungen der $[Mg^{2+}]$ im Serum und in den Zellen als regulative Parameter zur Erhaltung einer optimalen Energieversorgung im Gewebe bei verschiedensten metabolischen Bedingungen dienen.

2.8. Spezielles zum Mg^{2+} -Transport beim Schaf

In den vorherigen Abschnitten wurden die aktuellen Erkenntnisse über die Mg^{2+} -Homöodynamik und den Mg^{2+} -Transport an einer Vielzahl verschiedener Zellen

unterschiedlicher Spezies erläutert. In den nächsten Passagen wird speziell auf die Besonderheiten beim Schaf, insbesondere auf den ruminalen Mg^{2+} -Transport, eingegangen.

2.8.1. Die Lokalisation der Mg^{2+} -Resorption beim Schaf

Beim Wiederkäuer galt der Darm lange Zeit als Hauptort der Mg^{2+} -Resorption. Verschiedene Untersuchungen machten jedoch deutlich, dass beträchtliche Mg^{2+} -Mengen bereits vor dem Duodenum aufgenommen werden. TOMAS und POTTER (1976) sowie FIELD und MUNRO (1977) zeigten durch Infusionen von Mg^{2+} in die verschiedenen Vormagensektionen des Schafes, dass Mg^{2+} hauptsächlich aus dem Pansen resorbiert wird.

DALLEY et al. (1997) beobachteten, dass Mg^{2+} im Fall einer gestörten ruminalen Resorption aufgrund einer erhöhten Aufnahme von K^+ auch über die Darmabschnitte distal des Pansens resorbiert wurde. Dabei konnte aber die bedarfsgerechte Zufuhr von Mg^{2+} über solch eine kompensatorische Aufnahme von Mg^{2+} aus den distalen Darmabschnitten nicht gewährleistet werden.

Auch der Enddarm (Rektum, distales Kolon) erwies sich in Untersuchungen von MEYER und BUSSE (1975) als Ort mit einer relativ hohen Resorptionskapazität. Diese Erkenntnis ist vor allem wegen des praktischen Nutzens von Bedeutung. Hypomagnesämischen Rindern kann als erste helfende Maßnahme eine 20% bis 30%ige $MgCl_2$ -Lösung rektal infundiert werden (BELL et al., 1978).

2.8.2. Der Mg^{2+} -Transport über das Pansenepithel

Mg^{2+} wird über das mehrschichtige, verhornte Plattenepithel der Pansenwand resorbiert. Es muss dabei aus der Pansenflüssigkeit gegen einen elektrochemischen Gradienten ($\Delta\mu_{Mg}$) zum Blut transportiert werden. Dieser Gradient ergibt sich aus einer transmuralen Potenzialdifferenz (PD_t) von 20-70 mV (Blutseite positiv; Dobson und Phillipson, 1958; Scott, 1966) und einem chemischen Konzentrationsgefälle von 2-4 mmol/l Mg^{2+} mukosal auf 0.8-1.2 mmol/l Mg^{2+} serosal, wobei die transmurale Potenzialdifferenz die chemische Triebkraft überwiegt.

Der Transport über das Epithel ist theoretisch auf zwei Wegen möglich: parazellulär und transzellulär.

Der parazelluläre Transportweg, der auch als shunt bezeichnet wird, verläuft zwischen den Zellen. Dabei passieren die Elektrolyte tight junctions (bei PEZ Maculae occludentes; HENRIKSON, 1970) und den Interzellularraum durch einfache Diffusion gegen einen geringen parazellulären Widerstand (POWELL, 1981). Wäre dies der alleinige Transportweg für Magnesium, müsste aus der Betrachtung der oben erwähnten Triebkraftverhältnisse (PD_t , Blutseite positiv > chemischer Gradient) eine Netto- Mg^{2+} -Sekretion resultieren. Die parazelluläre Permeabilität für Mg^{2+} ist jedoch gering und in Untersuchungen (*in vivo* und *in vitro*) bei Schafen wurde wiederholt gezeigt, dass eine Netto- Mg^{2+} -Resorption stattfindet.

Der Mg^{2+} -Transport erfolgt also größtenteils transzellulär unter Beteiligung aktiver Transportmechanismen (LEONHARD, 1990; LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996; MARTENS et al., 1987).

Im Rahmen des transzellulären Transportes wird das Mg^{2+} -Ion über die apikale PEZ-Membran in die Zelle aufgenommen und über die basolaterale Membran aus der Zelle abgegeben. Der transzelluläre Mg^{2+} -Transport wird durch verschiedene Proteine, die sich in ihrer Aktivierung, Kinetik und Lokalisation voneinander unterscheiden, vermittelt (**Abb. 2**). Dabei ist derzeit noch ungeklärt, in welchem Maß die unterschiedlichen Transportmechanismen an der Aufrechterhaltung der optimalen zytosolischen $[Mg^{2+}]$ bzw. am gerichteten Mg^{2+} -Transport über das Pansenepithel (Bereitstellung von Mg^{2+} für den Gesamtorganismus) beteiligt sind.

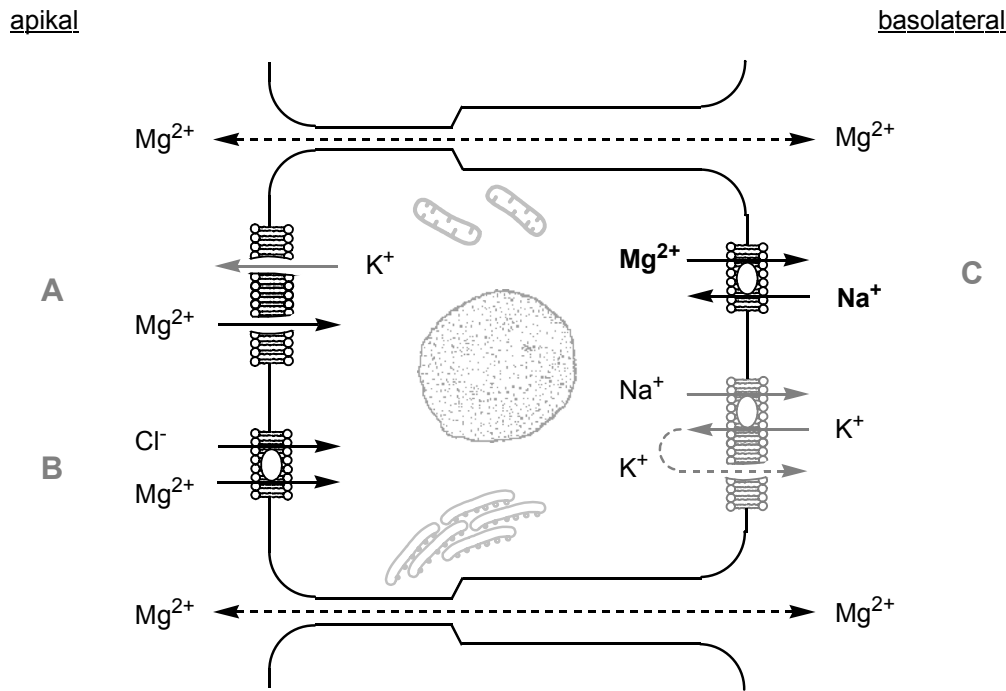


Abb. 2: Mg^{2+} -Transportmechanismen bei PEZ

Die Mg^{2+} -Aufnahme wird apikal über einen K^+ -sensitiven (A) und einen K^+ -insensitiven (B) Transport-mechanismus vermittelt. Die Mg^{2+} -Abgabe über die basolaterale Membran erfolgt über einen Na^+/Mg^{2+} -Austauscher (C).

2.8.3. Die Mechanismen der Mg^{2+} -Aufnahme in die PEZ

Die intrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration ($[Mg^{2+}]_i$) variiert bei isolierten PEZ zwischen 0.5 und 1.3 mmol/l (SCHWEIGEL et al., 1999) und ist damit geringer als die $[Mg^{2+}]$ in der Pansenflüssigkeit (2 bis 4 mmol/l; GEISHAUSER und GITZEL, 1995). Die Bestimmung der apikalen Potenzialdifferenz (PD_a) bei PEZ ergab Werte zwischen 47 und 67 mV (intrazellulär negativ; LANG und MARTENS, 1999; LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996; SCHWEIGEL et al., 1999). Die elektrische Potenzialdifferenz über die apikale Membran ist damit die Haupttriebkraft für die Aufnahme von Mg^{2+} aus dem Pansenlumen in die PEZ.

LEONHARD-MAREK und MARTENS (1996) sowie STUMPF et al. (2002) zeigten, dass in der apikalen Membran der PEZ K^+ -Leitfähigkeiten ausgebildet sind und dass Änderungen der luminalen K^+ -Konzentration ($[K^+]$) direkte Auswirkungen auf die PD_a haben (LEONHARD-

MAREK und MARTENS, 1996). Dementsprechend führt eine Erhöhung der luminalen $[K^+]$ zu einer Depolarisation der PD_a und somit zu einer Reduzierung des von mukosal nach serosal gerichteten Mg^{2+} -Fluxes ($J_{ms}^{Mg^{2+}}$). Zusätzlich kam es bei isolierten PEZ nach der Depolarisation des Membranpotenzials zu einer Abnahme der freien intrazellulären $[Mg^{2+}]$ (SCHWEIGEL et al., 1999). Aus diesen Befunden wurde gefolgert, dass die K^+ -sensitive Mg^{2+} -Aufnahme elektrodifusiv über einen Mg^{2+} -Kanal erfolgt (SCHWEIGEL et al., 1999).

Messungen des $J_{ms}^{Mg^{2+}}$ zeigten aber, dass ein größerer Teil der Mg^{2+} -Aufnahme (62%) durch eine K^+ -insensitive Komponente vermittelt wird (LEONHARD, 1990; LEONHARD-MAREK et al., 1998; LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996). Der K^+ -insensitive Mg^{2+} -Influx wird nach neueren Untersuchungen durch einen Kotransport von Mg^{2+} und Chlorid-Ionen (Cl^-) vermittelt (SCHWEIGEL und MARTENS, 2003). Am Pansenepithel sowie bei isolierten Pansenepithelzellen führte sowohl die Reduktion der extrazellulären $[Cl^-]$, als auch die Applikation von Furosemid (ein Hemmstoff Cl^- -abhängiger Kationentransporter) zu einem verminderten $J_{ms}^{Mg^{2+}}$ (LEONHARD, 1990) bzw. zu einer Verringerung der Mg^{2+} -Aufnahme in isolierte PEZ (SCHWEIGEL und MARTENS, 2003).

2.8.4. Die Mechanismen der Mg^{2+} -Abgabe

Mg^{2+} -Efflux beim Pansenepithel

In Versuchen an Pansenepithelien wurde beobachtet, dass sich nach Reduktion der serosalen $[Na^+]$ der von mukosal nach serosal gerichtete Mg^{2+} -Flux ($J_{ms}^{Mg^{2+}}$) deutlich verringerte. Es wurde angenommen, dass die Abgabe von Mg^{2+} über die basolaterale Membran durch einen Na^+/Mg^{2+} -Austauscher vermittelt wird. Die Energie für diesen Prozess, der gegen einen starken elektrischen Gradienten (PDb von 50 bis 70 mV, extrazellulär positiv; SCHWEIGEL und MARTENS, 2000) erfolgt, wird indirekt über die Na^+/K^+ -ATPase geliefert. Die Na^+/K^+ -ATPase hält den physiologischen Na^+ -Gradienten ($[Na^+]_e \gg [Na^+]_i$) aufrecht, was eine grundlegende Voraussetzung dafür ist, dass Mg^{2+} über den Na^+/Mg^{2+} -Austauscher aus der Zelle heraustransportiert werden kann.

Mg²⁺-Efflux bei Pansenepithelzellen

Auch bei isolierten PEZ konnte ein Na⁺-abhängiger Mg²⁺-Transport nachgewiesen werden. Mit Mg²⁺ vorbeladene PEZ (mittels A23187; REED und LARDY, 1972) zeigten eine Abgabe von Mg²⁺ in ein nominal Mg²⁺-freies Medium. Die Intensität des Effluxes nahm mit Erhöhung der [Na⁺]_e zu (SCHWEIGEL und MARTENS, 2001).

Der Na⁺-abhängige Mg²⁺-Transport funktionierte aber auch in entgegengesetzter Richtung. In Übereinstimmung mit bei Erythrozyten gemachten Erfahrungen (FLATMAN und SMITH, 1991) wurde auch bei Pansenepithelzellen durch eine Umkehr des physiologischen Na⁺-Gradienten ein Mg²⁺-Influx induziert (SCHWEIGEL et al., 2000). Parallel zum Mg²⁺-Influx kam es zu einer Reduktion der [Na⁺]_i. Die Na⁺-abhängige Mg²⁺-Aufnahme konnte durch eine schrittweise Erhöhung der extrazellulären [Na⁺] ([Na⁺]_e) vermindert bzw. vollständig gehemmt werden.

2.8.5. Hemmung des Mg²⁺-Transportes bei PEZ

Weder zum Na⁺/Mg²⁺-Austauscher noch zu einem der anderen genannten Mg²⁺-Transportsysteme liegen zur Zeit Erkenntnisse über deren molekulare Struktur vor. Das Fehlen dieser Information erschwert es in der Konsequenz, spezifische Hemmstoffe (pharmakologische Wirkstoffe, Antikörper) herzustellen bzw. die Effekte vorhandener Pharmaka zu interpretieren. Obwohl es Ansätze gibt, mittels monoklonaler Antikörper, den Na⁺/Mg²⁺-Austauscher zu hemmen (SCHWEIGEL und BUSCHMANN; nicht veröffentlicht), kann derzeit nur von einigen unspezifischen Blockern mit Bestimmtheit gesagt werden, dass sie einen hemmenden Einfluss auf den Mg²⁺-Transport bzw. speziell auf den Na⁺/Mg²⁺-Austauscher haben.

Bei PEZ wurde die Wirkung von Imipramin und Quinidin auf die intrazelluläre Mg²⁺-Konzentration untersucht. Die basale Mg²⁺-Influxrate von 49.1±8.1 μmol·l⁻¹·min⁻¹ ([Na⁺]_i > [Na⁺]_e, [Mg²⁺]_e = 5 mmol/l) sank nach der Gabe von 100 bzw. 500 μmol/l Imipramin auf Werte von 34.6±9.0 μmol·l⁻¹·min⁻¹ bzw. 24.6±5.5 μmol·l⁻¹·min⁻¹ (SCHWEIGEL et al., 2000). Auch die Applikation von Quinidin, einem K⁺-Kanalblocker, führte zur Reduktion der intrazellulären [Mg²⁺] um etwa 17±3.5% (50 μmol/l Quinidin) bzw. 30±3% (100 μmol/l Quinidin) gegenüber der Kontrolle (SCHWEIGEL und MARTENS, 2001).

2.8.6. Regulation des Mg^{2+} -Transportes bei PEZ

Untersuchungen, bei denen PEZ mittels cAMP bzw. Prostaglandin E_2 (PGE_2) stimuliert wurden, zeigten, dass der Mg^{2+} -Transport auch bei diesen Zellen über Hormone und second messenger moduliert werden kann.

Nach Stimulation der PEZ mit dem membrangängigen cAMP-Analogen db-cAMP (100 $\mu\text{mol/l}$) war eine Verringerung der zytosolischen $[Mg^{2+}]$ um etwa 300 $\mu\text{mol/l}$ über den gesamten Messzeitraum zu beobachten (SCHWEIGEL, 2001). Als Grund für diese Verminderung wurde ein positiv stimulierender Effekt des db-cAMP auf den Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Efflux angenommen.

Überraschenderweise reagierten die PEZ nach der Applikation von PGE_2 (100 nmol/l) mit einem Anstieg der $[Mg^{2+}]_i$ um 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (SCHWEIGEL, 2001). Diese Beobachtung war zunächst widersprüchlich zu Messungen bei verschiedenen anderen Zellen, bei denen eine Steigerung des Mg^{2+} -Effluxes nach PGE_2 -Stimulation gesehen wurde (**Kap. 2.6.2**). Da mit der verwendeten Messmethode nur Nettoänderungen der $[Mg^{2+}]_i$ feststellbar sind, bedeutet eine Erhöhung der $[Mg^{2+}]_i$ nicht zwingend, dass kein Mg^{2+} -Efflux stattfindet. So könnte beispielsweise ein PGE_2 -induzierter Mg^{2+} -Efflux durch die Mobilisierung von Mg^{2+} aus intrazellulären Speichern bzw. durch eine Aktivierung von Mg^{2+} -Influxmechanismen maskiert sein.

2.9. Literaturzusammenfassung und Ziel eigener Untersuchungen

2.9.1. Literaturzusammenfassung

Mg^{2+} ist ein essentieller Bestandteil vieler zellphysiologischer Prozesse. Der Aufrechterhaltung der Mg^{2+} -Homöodynamik auf zellulärer Ebene sowie im Gesamtorganismus kommt daher eine wichtige Rolle zu. Beim Wiederkäuer wird Mg^{2+} hauptsächlich aus dem Pansen resorbiert, wobei transzelluläre, aktive Transportprozesse dominieren. Auf der apikalen Seite wird Mg^{2+} über einen K^+ -sensitiven (Kanal) und einen K^+ -insensitiven Transportmechanismus (Mg^{2+} -Anionen-Kotransporter) aufgenommen. Unter physiologischen Bedingungen dominiert der K^+ -insensitive Transportmechanismus. Basolateral wird Mg^{2+} gegen einen elektrochemischen Gradienten über den Na^+/Mg^{2+} -Austauscher aus der Zelle geschleust.

Der Na^+/Mg^{2+} -Austauscher wurde bisher an einer Vielzahl von Zellen untersucht. Seine Aktivität wird durch Konzentrationsänderung der am Transport beteiligten Ionen sowie durch hormonelle Stimulation beeinflusst. Bisher existieren keine spezifischen Hemmstoffe für den Na^+/Mg^{2+} -Austauscher, aber es wurden Effekte anderer Hemmstoffe (Amilorid, Imipramin, Quinidin) auf den Austauscher nachgewiesen. Eine Reihe von Eigenschaften wird als charakteristisch für den Na^+/Mg^{2+} -Austauscher angesehen. Dazu gehören:

- Der Na^+/Mg^{2+} -Austauscher vermittelt unter physiologischen Bedingungen einen Mg^{2+} -Efflux.
- Die Transportrate des Effluxes ist abhängig von der extrazellulär angebotenen $[Na^+]$ sowie von der freien zytosolischen $[Mg^{2+}]$. Der K_M -Wert für Na^+ beträgt etwa 20 mM.
- Bei einigen Zellsystemen kann der Transporter reversibel arbeiten, d.h. durch Umkehr des Na^+ -Gradienten lässt sich ein Mg^{2+} -Influx induzieren.
- Der Na^+/Mg^{2+} -Austauscher wird durch Amilorid, Imipramin und Quinidin unspezifisch gehemmt.
- Bestimmte Hormone und Mediatoren haben aktivierende (Isoproterenol, Katecholamine) bzw. hemmende (Insulin) Effekte auf den Mg^{2+} -Transport. Bei PEZ führte eine Stimulation mit cAMP zur Steigerung des Mg^{2+} -Effluxes. Dagegen war nach PGE_2 -Gabe eine Erhöhung der freien intrazellulären $[Mg^{2+}]$ zu beobachten.

2.9.2. Schwerpunkt eigener Untersuchungen

Das Ziel der eigenen Arbeit war es, Mg^{2+} -Effluxmechanismen bei kultivierten Pansenepithelzellen nachzuweisen und zu charakterisieren. Mittels fluoreszenzspektrometrischer Methoden sollte insbesondere die Na^+ -abhängige Komponente der Mg^{2+} -Abgabe unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Ein weiterer Schwerpunkt war darauf ausgerichtet, mögliche Regulationsmechanismen des Mg^{2+} -Effluxes zu überprüfen.

Zu diesem Zweck wurden folgende Versuchsreihen durchgeführt:

- Nachweis einer Na^+ -abhängigen Komponente der Mg^{2+} -Abgabe bei kultivierten PEZ durch Variation der extrazellulären $[Na^+]$,
- Charakterisierung des Na^+/Mg^{2+} -Ausauschers bei PEZ durch die Bestimmung kinetischer Parameter sowie durch den Einsatz von Hemmstoffen,
- Quantifizierung der Na^+ -abhängigen Komponente und Identifizierung weiterer möglicher Effluxmechanismen,
- Überprüfung der Ergebnisse aus den intrazellulären Untersuchungen zur Regulation der Mg^{2+} -Abgabe aus PEZ. Dazu wurde der Einfluss einer erhöhten intrazellulären $[cAMP]$ sowie der Effekt von exogenem PGE_2 auf den Mg^{2+} -Efflux getestet.